

11-13-1-97, утв. Гл. госуд. сан. врачом Респ. Беларусь 16.01.1997. – Минск, 1997. – 12 с.

16. Определение микробиологической чистоты дезинфицирующих и антисептических средств: инструкция № 4.2.10.-22-102-2005, утв. Гл. госуд. сан. врачом Респ. Беларусь 30.12.2005. – Минск, 2005. – 7 с.

17. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: инстр. 1.1.11-12-35-2004, утв. пост. Гл. госуд. сан. врача Респ. Беларусь 14.12.2004, № 131. – Минск, 2004. – 41 с.

18. Изучение стабильности и установ-

ление сроков годности новых субстанций и готовых лекарственных средств: метод. указ. 09140.07-2004. – Минск: ЛОТИОС, 2004. – 57 с.

#### Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
кафедра общей гигиены и экологии,  
тел. раб.: 8 (0212) 37-08-28,  
Бурак И.И.

Поступила 18.04.2014 г.

С.Э. Ржеусский<sup>1</sup>, Е.А. Авчинникова<sup>2</sup>, С.А. Воробьева<sup>2</sup>

### НАНОДИАГНОСТИКА И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ МЕДИ

<sup>1</sup>Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет

<sup>2</sup>Учреждение Белорусского государственного университета  
«Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»

*Одним из перспективных направлений создания новых лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, является использование наночастиц металлов. Они обладают выраженной бактерицидной, противовирусной, фунгицидной и иммуномодулирующей активностью, оставаясь при этом малотоксичными и не вызывающими резистентности микроорганизмов.*

*Проведена нанодиагностика и исследована антимикробная активность наночастиц металлической меди и ее оксида. Установлена зависимость этого показателя от размера частиц, концентрации водной взвеси и времени инкубации.*

*Показан широкий спектр действия наночастиц металла на грамположительные, грамотрицательные, спорообразующие микроорганизмы, грибы. Определено, что наночастицы меди могут быть рекомендованы в качестве одного из компонентов противомикробных или противогрибковых лекарственных средств.*

**Ключевые слова:** нанотехнология, нанодиагностика, наночастицы меди, медь, антимикробная активность, антибиотикорезистентность.

#### ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений создания новых лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, является использование наночастиц металлов. Они проявляют выраженную бактерицидную, противовирусную, фунгицидную и иммуномодулирующую активность [1], оставаясь при этом малотоксичными [2] и не вызывающими резистентности [3].

Благодаря своим размерам (менее 100 нм), сопоставимым с размерами клеток (10 – 100 мкм), вирусов (20 – 450 нм), белков (5 – 50 нм), ДНК (2 нм шириной, 10 – 100 нм длиной), наночастицы могут приближаться к биообъекту, взаимодействовать и связываться с ним [4].

Целью настоящего исследования было проведение нанодиагностики полученных в лаборатории порошков наночастиц меди, установление их антимикробной активности и спектра действия.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В качестве объекта исследования использовали образцы наночастиц меди, полученные в учреждении Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» (г. Минск).

Образцы получали восстановлением сульфата меди боргидридом натрия (образец №1) или боргидридом натрия и гидразингидратом (образцы №2 – 4) в присутствии макрогола в качестве стабилизатора. Для уменьшения концентрации растворен-

ного кислорода через раствор, содержащий сульфат меди и макрогол-4000, при интенсивном перемешивании пропускали аргон. Затем к смеси добавляли восстановитель и продолжали перемешивать реакционную смесь при непрерывном пропускании аргона. Образовавшийся осадок промывали методом декантации в случае образования хлопьеобразного осадка или центрифугировали при образовании мелких частиц. Осадок промывали этиловым спиртом и высушивали в эксикаторе [5]. Условия синтеза наночастиц меди приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Условия синтеза наночастиц меди

Номер образца	Молярное соотношение $\text{Cu}^{2+}$ :ПЭГ	Температура синтеза, °C	Скорость приливания $\text{NaBH}_4/\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , мл/мин
1	1:6	20	3,3/ –
2	1:3	20	60/30
3	1:1	60	60/30
4	1:3	60	2,5/1,25

Для получения наночастиц оксида меди к нагретому до температуры 80 – 90°C раствору гидроксида натрия приливали раствор пентагидрата сульфата меди, полученную смесь нагревали при температуре 90°C в течение 10 – 15 мин. Образовавшийся осадок промывали водой очищенной методом декантации до нейтральной реакции на сульфат-ион. Затем к водной суспензии осадка приливали 5 мл раствора аммиака 25% и оставляли смесь для старения на 1,5 – 2,0 ч, после чего осадок промывали, отделяли фильтрованием и сушили при температуре 200 – 300°C [6].

Рентгенофазовый анализ образцов проводили на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3 с использованием  $\text{CoK}\alpha$ -излучения в интервале углов  $2\theta = 10-90^\circ$ . Соотношение меди металлической и оксида меди (I) в образцах рассчитывали исходя из корундовых чисел базы данных PDF-2:

$$I_{\text{Cu}} = 8,86 \cdot I_{\text{Cor}} \quad (1),$$

$$I_{\text{Cu}_2\text{O}} = 8,28 \cdot I_{\text{Cor}} \quad (2),$$

где  $I_{\text{Cu}}$ ,  $I_{\text{Cu}_2\text{O}}$ ,  $I_{\text{Cor}}$  – интенсивности пиков меди, оксида меди (I) и корунда на рентгенограммах образцов, содержащих 1 г меди и 1 г корунда (формула 1), 1 г оксида меди (I) и 1 г корунда (формула 2) [5].

Электронно-микроскопические ис-

следования проводили на электронном микроскопе LEO-906. Образцы готовили следующим образом: полученный в результате синтеза осадок редиспергировали в течение 10 мин в этиловом спирте в ультразвуковой ванне SONOREX RK-52, затем каплю полученной суспензии помещали на медную сетку, покрытую углеродной пленкой, и высушивали на воздухе. Размеры наночастиц определяли по микрофотографиям [5].

Антимикробную активность наночастиц оценивали следующим образом: суспензию нанопорошков меди готовили в воде очищенной, получая следующие концентрации: 0,10%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, 1,00%. В пробирки с разведениями наночастиц добавляли по 100 мкл суспензии (100 000 КОЕ/мл) микроорганизмов, встряхивали и инкубировали в течение 15, 30 и 60 мин при комнатной температуре. В качестве контроля использовали бактериальную суспензию, разведенную в питательном растворе. По окончании инкубации из каждого разведения производили высеив на чашки Петри с твердой питательной средой (ГМФ-агар) в количестве 100 мкл и инкубировали 24 ч при температуре 37°C [7].

Исследование спектра действия наночастиц проводили методом диффузии в агар (2.7.2. А) с использованием цилин-

дров из нержавеющей стали [ГФ РБ]. В качестве тест-культур использовали грамположительные (*Pseudomonas aeruginosa*), грамотрицательные (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) и спорообразующие (*Bacillus subtilis*) микроорганизмы и грибы (*Candida albicans*).

В качестве лекарственных средств сравнения использовали мазь Левомеколь, производства Нижфарм, Россия (левомицетин – 7,5 мг, метилурацил – 40 мг), гель стоматологический Холисал, производства Pharmaceutical Works Jelfa S.A., Польша (холина салицилат – 87,1 мг, цеталкония хлорид – 0,1 мг) и гель Метродент, производства Synmedic Laboratories, Индия (метронидазол – 10 мг, хлоргексидина глюконат – 2,5 мг).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью компьютерной программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что изученные образцы наночастиц №1–4 содержали металлическую медь и оксид меди в разных соотношениях (I). Образец №5 содержал только оксид меди (I).

Показано, что все наночастицы характеризуются широким распределением частиц по размерам (максимальные и минимальные размеры наночастиц в образце различаются от 2,5 раза (для образца №2) до 7,1 раза (для образца №5). Наименьший средний размер характерен для образцов №1 и №5 (таблица 2). Наночастицы образцов №1–4 имели сферическую форму, образец №5 – продолговатую (рисунок 1).

Установлено, что суспензии наночастиц меди размером 59,4 нм в концентрации 1,0% уже через 30 мин практически полностью подавляли рост микроорганизмов (97,4%,  $p < 0,05$ ). В то же время действие наночастиц меди в концентрации

0,1% при таком же времени инкубации не приводило к статистически достоверному уменьшению количества колоний, выросших на питательной среде, по сравнению с контролем ( $p > 0,05$ ). Определено, что с увеличением времени инкубации статистически значимо ( $p < 0,05$ ) увеличивается антимикробный эффект для всех исследованных концентраций (рисунок 2).

Было проведено исследование зависимости антимикробного эффекта суспензий наночастиц от их размера. Показано, что с уменьшением размера частиц от 59,4 до 14,4 нм антимикробный эффект возрастает линейно для суспензий с содержанием наночастиц от 0,25 до 0,75% до достижения 100% эффективности (рисунок 3).

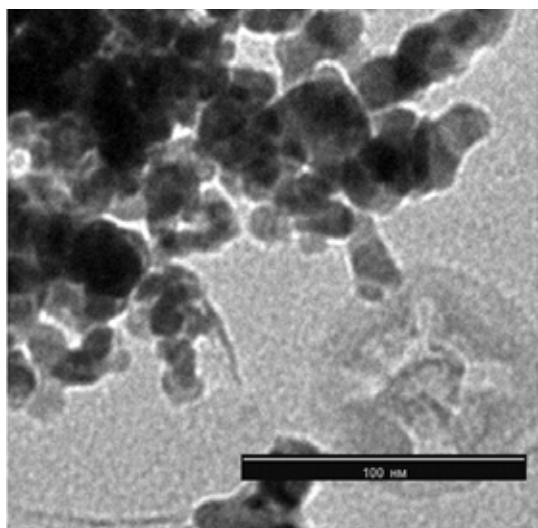
Металлическая медь под действием кислорода воздуха постепенно окисляется до оксида меди, поэтому была изучена сравнительная антимикробная активность наночастиц металлической меди и ее оксида, размер которых статистически значимо не различался ( $p > 0,05$ ) (рисунок 4).

Установлено, что наночастицы оксида меди также обладают антимикробной активностью, как и наночастицы металлической меди, однако она в 9,1 раза слабее для суспензии с концентрацией 0,1%.

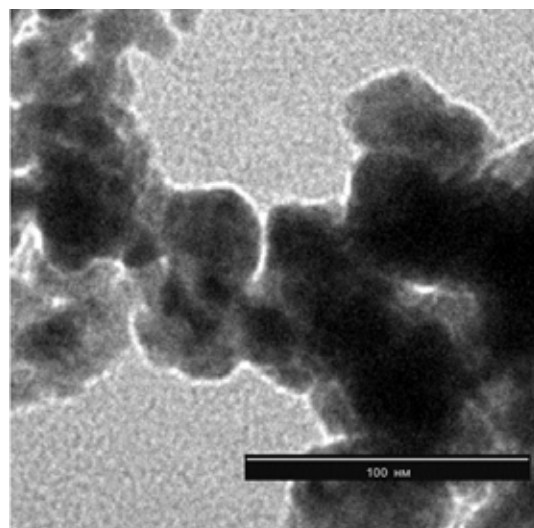
При изучении спектра действия показано, что наночастицы меди обладают широким антимикробным эффектом, но он по силе уступает эффекту распространенного на фармацевтическом рынке Республики Беларусь лекарственного средства Левомеколь ( $p < 0,05$ ). Определено, что Левомеколь оказывает более сильное действие на грамположительные микроорганизмы (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), в то время как модельный гель с наночастицами наибольшую активность проявлял по отношению к спорообразующим микроорганизмам (*Bacillus subtilis*), его действие по отношению к грамотрицательным и грамположительным микроорганизмам статистически значимо не отличалось ( $p > 0,05$ ) (рисунок 5).

Таблица 2 – Основные физико-химические свойства образцов наночастиц меди

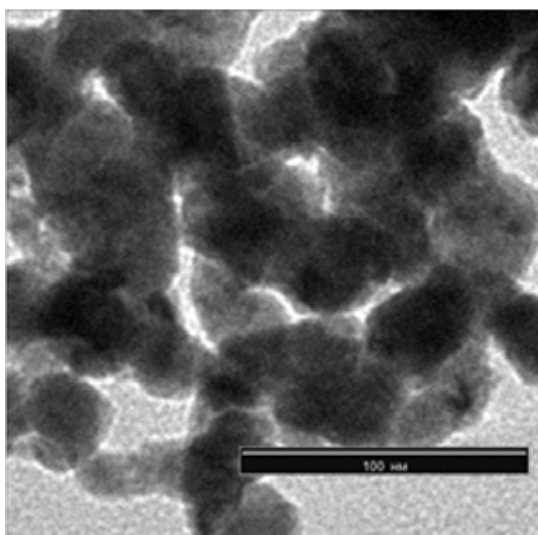
Номер образца	Соотношение Cu:Cu <sub>2</sub> O, %, n=1	Средний размер частиц, нм, n=100	Размер частиц, нм, n=100
1	83,3:16,7	14,4	7,5 – 28,3
2	89,4:10,6	19,9	13,5 – 34,6
3	94,9:5,1	36,7	17,0 – 88,7
4	96,9:3,1	59,4	30,3 – 109,4
5	0:100,0	11,1	3,0 – 21,2



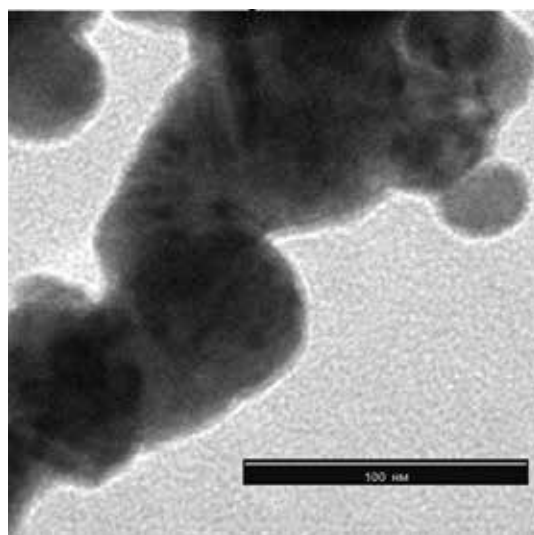
Образец 1



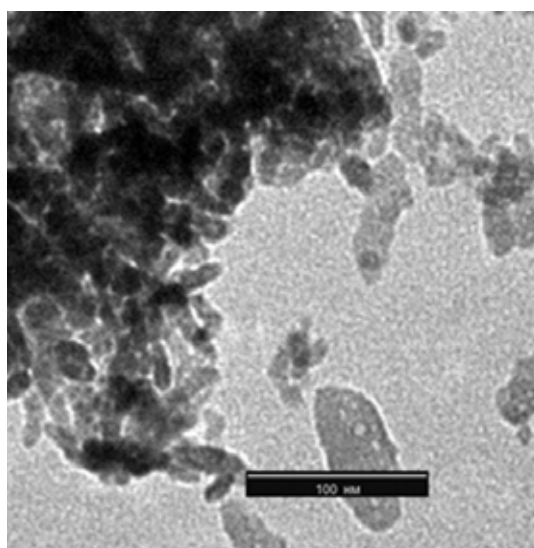
Образец 2



Образец 3



Образец 4



Образец 5

Рисунок 1 – Микрофотографии различных образцов наночастиц меди

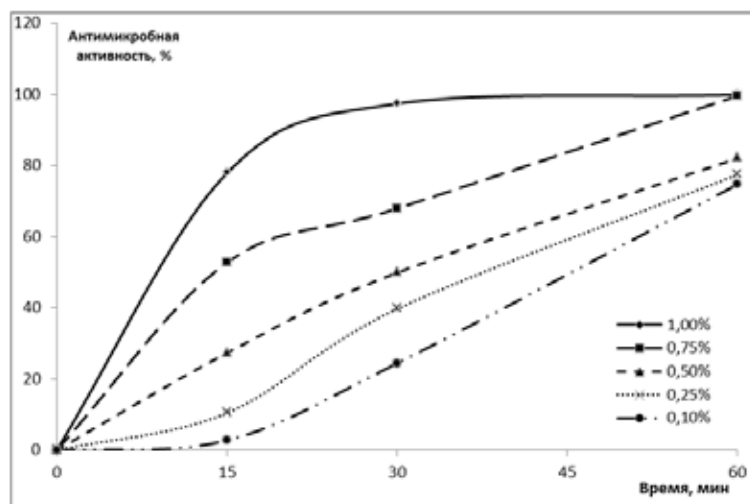


Рисунок 2 – Влияние концентрации суспензии и времени инкубации на антимикробную активность наночастиц меди, образец №4, n=10

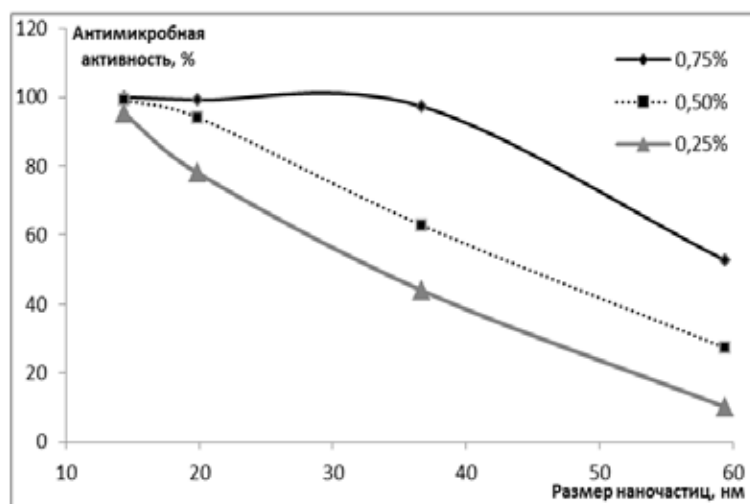


Рисунок 3 – Зависимость антимикробного эффекта взвесей наночастиц меди от их размера через 15 мин инкубации, n=10

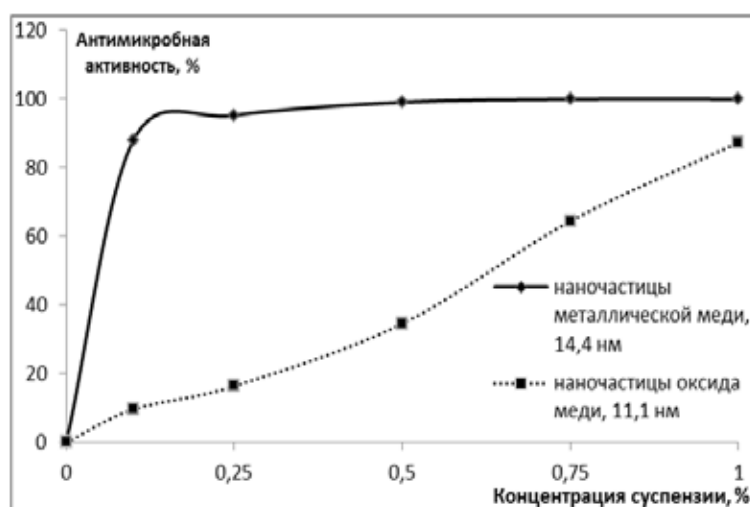


Рисунок 4 – Антимикробная активность наночастиц металлической меди и ее оксида различных концентраций при времени инкубации 15 мин, n=10

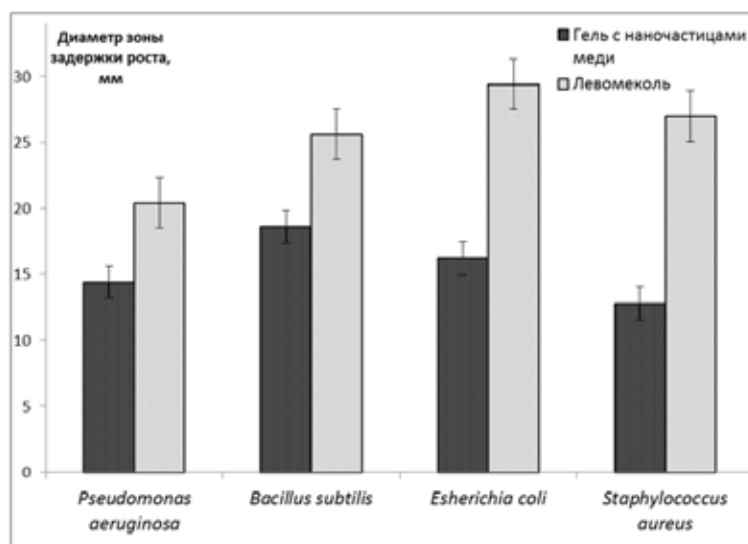


Рисунок 5 – Спектр действия наночастиц меди по отношению к микроорганизмам бактериальной природы, n=5

Установлено, что наночастицы меди обладают противогрибковым эффектом, незначительно уступающим эффекту существующих аналогов, таких как Метродент и Холисал ( $p < 0,05$ ) (рисунок 6).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о перспективности

дальнейших исследований наночастиц меди в качестве противомикробного и противогрибкового средства, поскольку, несмотря на более низкую активность, наночастицы меди лишены недостатков, присущих антибиотикам – резистентность микроорганизмов и токсичность [8].

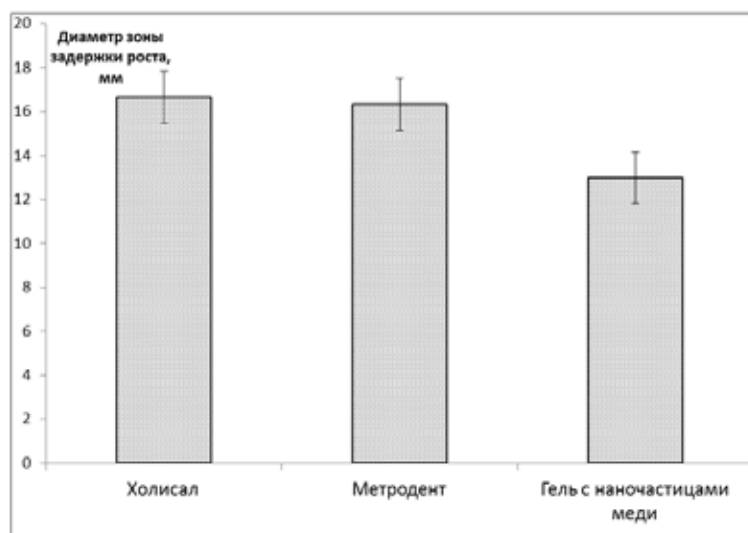


Рисунок 6 – Активность наночастиц меди по отношению к микроскопическим грибам, n=3

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования определены физические и химические свойства наночастиц меди: размер, форма, фазовый состав. Выявлен их антимикробный эффект по отношению к грамположительным, грамотрицательным, спорообразую-

щим микроорганизмам, грибам. Показана зависимость антимикробного эффекта от размера наночастиц и их концентрации. Определено, что наночастицы меди могут быть рекомендованы в качестве одного из компонентов противомикробных или противогрибковых лекарственных средств.

Установлено, что наночастицы окси-

да меди также проявляют антимикробный эффект, однако он слабее, чем у наночастиц металла.

### SUMMARY

S.E. Rzhessky, A.A. Auchynnikava,  
S.A. Vorobyova  
NANODIAGNOSTICS AND  
ANTIMICROBIAL PROPERTIES  
OF COPPER NANOPARTICLES

One of the promising areas of development of new drugs having antimicrobial activity is the use of metal nanoparticles. They have a pronounced antibacterial, antiviral, antifungal and immunomodulatory activity, while remaining low-toxic and do not cause microbial resistance.

Nanodiagnosics was carried out and the antimicrobial activity of nanoparticles of metal copper and its oxide was investigated. The dependence of the indicator on the size of particles, the concentration of the aqueous suspension and the time of incubation was determined.

A wide range of activity of metal nanoparticles against Gram-positive, Gram-negative, spore-forming microorganisms, fungi was shown. It was determined that the copper nanoparticles can be recommended as a component of antimicrobial or antifungal drugs.

Keywords: nanotechnology, nanodiagnosics, copper nanoparticles, copper, antimicrobial activity, antibiotic resistance.

### ЛИТЕРАТУРА

1. К вопросу о токсичности наночастиц серебра при пероральном введении коллоидного раствора / Е.Н. Петрицкая [и др.]. // Альманах клинической медицины. – 2011, №25. – С. 9 – 12.

2. Нанодиагностика (материаловедческая аттестация) нанопорошков на основе

металлов, используемых при создании ранозаживляющих препаратов / И.П. Арсентьева [и др.]. // Нанотехнологии: наука и производство – 2009, №2(3). – С. 7 – 11.

3. Букина, Ю.А. Антибактериальные свойства и механизм бактерицидного действия наночастиц серебра / Ю.А. Букина, Е.А. Сергеева // Вестник Казанского технологического университета. – 2012. – №14. – С. 170–172.

4. Salata, O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine / [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/2/1/3>. – Дата доступа: 04.07.2010.

5. Авчинникова, Е.А. Синтез и свойства наночастиц меди, стабилизированных полиэтиленгликолем / Е.А. Авчинникова, С.А. Воробьева // Вестник БГУ. Сер.2. 2013. – №3. – С.12 – 16.

6. Карякин, Ю.В., Чистые химические вещества / Ю.В. Карякин, И.И. Ангелов. – Изд. 4-е, пер. и доп. М., «Химия», 1974. – 408 с., 66 рис.

7. Изучение физических свойств и биологической активности наночастиц меди / И.А. Мамонова [и др.]. // Российские нанотехнологии. – 2013, Т 8. – №5–6. – С. 25 – 29.

8. Долгова, Т. Антибиотики: опасная популярность / Т. Долгова // Аптекарь. – 2014. – №4. – С. 38 – 40.

### Адрес для корреспонденции:

210023, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов  
медицинский университет»,  
кафедра организации и экономики  
фармации с курсом ФПК и ПК,  
тел. раб.: 8 (0212) 60-14-08,  
Ржеусский С.Э.

Поступила 20.08.2014 г.

О.М. Хишова

### ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТОНКО ИЗМЕЛЬЧЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ СУБСТАНЦИЙ И НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ ИХ ТАБЛЕТИРОВАНИЯ

Витебский государственный орден Дружбы народов медицинский университет

*В статье представлены результаты систематических исследований в области изучения технологических свойств тонко измельченных растительных субстанций*